

Avaliação da toxicidade aguda do epóxilimoneno em camundongos adultos

Evaluación de la toxicidad aguda en adultos epóxilimoneno ratones

Evaluation of the acute toxicity of limonene epoxide in adult mice

Antonia Amanda Cardoso de Almeida,^I Rusbene Bruno Fonseca de Carvalho,^I Damião Pergentino de Sousa,^{II} Geane Felix de Souza,^{III} Johanssy da Silva Oliveira,^I Riveliilson Mendes de Freitas^I

^I Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

^{II} Departamento de Fisiologia da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

^{III} Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

RESUMO

Introdução: a biodiversidade da flora mundial proporciona moléculas importantes no tratamento e na prevenção de várias enfermidades humanas, porém na maioria das vezes não são avaliadas sua toxicidade.

Objetivo: avaliar a toxicidade do monoterpenóide epóxilimoneno em camundongos tratados de forma aguda com doses repetidas (25, 50 e 75mg/kg) por via oral em parâmetros bioquímicos e hematológicos.

Métodos: quarenta camundongos correspondendo a quatro grupos (n=10/grupo) foram tratados, por via oral de forma aguda com doses repetidas e observados durante 14 dias, com epóxilimoneno nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg emulsificado em Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9 % (grupos EL25, EL50 e EL75, respectivamente), e com veículo (Tween 80, 0,05 % dissolvido em solução salina 0,9 %, grupo controle).

Resultados: o tratamento não causou nenhuma morte ou sinal de toxicidade nos animais.

Discussão: dessa forma, baseado nos resultados obtidos a partir dos estudos hematológicos e bioquímicos em camundongos, pode ser sugerido que a administração do epóxilimoneno não produz efeitos tóxicos sobre a maioria dos parâmetros analisados e que pode ser usado de forma segura em ensaios pré-clínicos. No entanto, mais estudos devem ser realizados para garantir que esse derivado de um monoterpeno natural seja utilizado de forma segura na indústria alimentícia e farmacêutica.

Palavras-chave : epóxilimoneno, bioquímica, hematologia, toxicidade aguda.

RESUMEN

Introducción: la biodiversidad global de la flora proporciona moléculas importantes para el tratamiento y prevención de diversas enfermedades humanas, pero más a menudo no se evalúa su toxicidad.

Objetivo: evaluar la toxicidad de lepóxilimoneno monoterpenoide en los ratones tratados de forma aguda con dosis repetidas (25, 50 y 75 mg/kg) por vía oral en los parámetros hematológicos y bioquímicos.

Métodos: cuarenta ratones que representan cuatro grupos (n = 10/grupo) fueron tratados con dosis por vía oral de forma aguda repetida y se observaron durante 14 días con elepóxilimonenoa dosis de 25, 50 y 75 mg/kg emulsionados enTween 80 0,05 % disuelto en solución salina 0,9 % (grupos EL25, EL50 y EL75, respectivamente), y vehículo (Tween 80, 0,05 % disuelto en solución salina 0,9 %, grupo de control).

Resultados: El tratamientono causó muertes ni signos de toxicidad en animales.

Discusión: de este modo, sobre la base de los resultados obtenidos a partir de los parámetros hematológicos y bioquímicos en ratones, se puede sugerir que la administración de epóxilimoneno no produce efectos tóxicos en la mayoría de los parámetros analizados y se puede utilizar de forma segura en la pre-clínica. Sin embargo, se deben realizar más estudios para asegurar que el derivado de un monoterpeno natural puede ser usado con seguridad en la industria alimentaria y farmacéutica.

Palabras clave : epóxilimoneno, bioquímica, hematología, toxicidad aguda.

ABSTRACT

Introduction: the biodiversity of global flora provides important molecules for the treatment and prevention of various human diseases, but most often their toxicities are not evaluated.

Objective: evaluate the toxicity of monoterpenoid limonene epoxidein mice treated acutely with repeated doses (25, 50 and 75 mg/kg) orally on hematological and biochemical parameters.

Methods: forty mice divided infour groups (n = 10/group) were treated orally andacutely with repeated doses and observed for 14 days. The mice were treatedwith limonene epoxide administered at doses of 25, 50 and 75 mg / kg emulsified with 0.05 % Tween 80 dissolved in 0.9 % saline (groupsEL25, EL50 and EL75, respectively)and withvehicle (0.05 % Tween 80, dissolved in 0.9% saline, control group).

Results: the treatment caused no deaths or signs of toxicity in the mice treated.

Discussion: thus, based on the results obtained from hematological and biochemical studies in mice, it can be suggested that limonene epoxide does not

produce anytoxic effect on most of the parameters analyzed, and can be safely used in pre-clinical-assays However, more studies should be conducted to ensure that this derivative of a natural monoterpene can be safely used in the food and pharmaceutical industry.

Key words: limonene epoxide, biochemistry, hematology, acute toxicity.

INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais tem sido associado ao fato de ser uma importante fonte para obtenção de moléculas com potencial farmacológico. A população dos países em desenvolvimento utiliza as plantas medicinais por tradição. Por outro lado, nos países desenvolvidos, observa-se um maior uso de fito medicamentos, principalmente devido ao modismo associado ao consumo desses produtos.¹ O conceito muitas vezes perigos o adotado pela população em geral é que o uso de plantas medicinais não representa quaisquer riscos para a saúde humana por serem naturais e terem sido testadas por meio da utilização na medicina popular.²

A avaliação da segurança e eficácia de plantas medicinais, bem como de seus constituintes ativos é extremamente necessária, pois as reações tóxicas e efeitos adversos dos fitomedicamentos são um problema de saúde pública. Além disso, podem ser observadas adulterações na matéria prima e interações com outras drogas ainda não investigadas sobre os constituintes químicos presentes em plantas medicinais.¹

Entre os constituintes ativos presentes em plantas aromáticas podem ser destacados os monoterpenos que são os principais componentes químicos dos óleos essenciais responsáveis por inúmeras atividades biológicas descritas na literatura. Os monoterpenos podem ser divididos em três subgrupos: acíclicos (mirreno, linalol e geraniol), monocíclicos (a terpineole e D-limoneno) e bicíclicos (a-pineno e cânfora). Em cada um desses subgrupos, há ainda outras classificações como os hidrocarbonetos insaturados (limoneno), os álcoois (mentol), os aldeídos ou cetonas (mentona e carvona), as lactonas (nepelactona) e as tropolonas (g-tujaplicina).³ Outros constituintes derivados de óleos essenciais podem ser obtidos por meio de reações químicas a partir destes componentes, como por exemplo: o epóxilimoneno, obtido por meio da epoxidação do (+)-limoneno.⁴

No caso dos óleos essenciais dos gêneros *Citrus* em geral, o R-(+)-limoneno é seu componente principal. O limoneno, um monoterpeno monocíclico é um dos constituintes do óleo essencial de mais de 300 espécies de vegetais. Os dois enantiômeros do limoneno são os mais abundantes monoterpenos na natureza. S-(-)-limoneno é principalmente encontrado em uma variedade de plantas e ervas como *Mentha* spp, enquanto R-(+)-limoneno é o componente majoritário dos óleos das cascas e folhas de *Citrus limon* Burmedas folhas de *Carum carvi* Lindl.^{5,6} Devido ao fato de ser facilmente disponibilizados como resíduo da indústria de sucos cítricos e obtido de fonte renovável, indústrias como farmacêutica, química e alimentícia têm demonstrado grande interesse pelos derivados oxigenados do limoneno.⁷

Dentre estes derivados oxigenados destaca-se os epóxidos, que são éteres cíclicos de três elementos formando um anel epóxido. Esses éteres possuem propriedades específicas devido à sua alta reatividade. Devido à baixa estabilidade desse anel e a facilidade de reagir com ácidos e bases, os epóxidos são largamente empregados como intermediários em sínteses orgânicas.⁸ Dentre esses epóxidos pode ser destacado o epóxilimoneno que é bastante utilizado na fabricação de resinas, pigmentos, tintas, adesivos, cosméticos e de solventes biodegradáveis bastante utilizados pela população em general.⁹

No entanto, ainda não foi investigada a segurança do uso do derivado do monoterpene em ensaios pré-clínicos. Dessa forma, o presente trabalho objetivou avaliar a toxicidade aguda do epóxilimoneno em camundongos adultos, com intuito de avaliar sua segurança para uso como molécula bioativa em formulações farmacêuticas.

MÉTODOS

Obtenção do epóxilimoneno

O epóxilimoneno é resultado da oxidação do limoneno (Ilustração 1) e foi preparado em laboratório, utilizando um balão de 250 mL, contendo uma solução de (R)-(+)-limoneno (1,0 g; 7,35 mmols) em CH₂Cl₂ (40 mL), e seguida foi adicionado, vagarosamente, uma solução de ácido *m*-cloroperbenzóico (AMCPB) 70 % (1,817 g; 7,35 mmols) em CH₂Cl₂ seco (40 mL), e mantido a temperatura de 0 °C (banho de gelo). O melhor acional foi mantido obagitação por um período adicional de 4 horas na mesma temperatura. Após esse tempo, foi retirado o banho de gelo e adicionado a mistura reacional quatro porções de 50 mL de solução aquosa de NaHSO₃ 10 %. A fase aquosa foi extraída com duas porções de 50 mL de CH₂Cl₂ e, as fases orgânicas combinadas foram lavadas com uma solução de NaHCO₃ 5 % (2 porções de 50 mL) e secas com Na₂SO₄ anidro. Em seguida, o solvente foi concentrado em evaporador rotativo. O produto foi purificado em coluna cromatográfica de gel de sílica sendo utilizado como eluente uma mistura de hexano e AcOEt (9:1). Foi obtido o epóxilimoneno com 48,30 % (3,55 mmols) de rendimento.^{10, 11}

Animais

Camundongos *Swiss* machos com dois meses de idade e peso variando entre 25 a 30 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí foram utilizados nos ensaios pré-clínicos. Os animais receberam água e dieta (Labina®) *ad libitum* e foram mantidos sob condições controladas de iluminação (com ciclo claro/escuro de 12 h) e temperatura (25 ± 1 °C).

Estudo da toxicidade aguda do epóxilimoneno em parâmetros bioquímicos e hematológicos

Quarenta camundongos correspondendo a quatro grupos (n=10/grupo) foram tratados, por via oral de forma aguda com doses repetidas e observados durante 14 dias, com epóxilimoneno nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg emulsionado em Tween

80 0,05 % dissolvido em solução salina 0,9 % (grupos EL25, EL50 e EL75, respectivamente), e com veículo (Tween 80, 0,05 % dissolvido em solução salina 0,9 %, grupo controle).

Durante o tratamento, a massa corporal dos animais foi registrada diariamente e os animais avaliados quanto a sinais clínicos de toxicidade, produção de excretas, consumo de água e ração. Ao final do tratamento, os animais foram submetidos a um jejum de 12 h e anestesiados com pentobarbital sódico na dose de 40 mg/kg (i.p.). Em seguida, foi feita à coleta de sangue por rompimento do plexo retro-orbital com auxílio de capilar de vidro.¹² O sangue foi acondicionado em dois tipos de tubo: um com anticoagulante (Laborlab®) para determinação dos parâmetros hematológicos, e o outro, sem anticoagulante, para obtenção do soro para avaliação dos parâmetros bioquímicos.

Para análise bioquímica, o material foi centrifugado a 3000 rpm durante 30 minutos e, em seguida, determinados os parâmetros glicose, uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), colesterol total, triglicerídeos, fosfatase alcalina, bilirrubinas total e direta, proteínas totais e ácido úrico. Os ensaios foram realizados em aparelho automático Labmax 240 com sistemas comerciais da LABTEST®.

Os valores para eritrócitos, leucócitos totais, plaquetas, hemoglobina, hematócrito, neutrófilos, linfócitos e os índices hematimétricos [volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)] foram determinados imediatamente após a coleta por meio do analisador automático de células hematológicas Advia 120/ *hematology* (Siemens). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensões coradas com *May-Grünwald-Giemsa*. Em cada ensaio, 100 células foram analisadas e contadas.

Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) do número de animais usados nos experimentos. As diferenças entre os grupos foram determinadas por meio da Análise de Variância (ANOVA), seguida, quando detectada diferença, pelo teste *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi sempre \geq a 5 %.

RESULTADOS

A administração por via oral de forma aguda com as diferentes doses de epóxilimoneno, não demonstrou nenhum sinal clínico de toxicidade, bem como não produziu nenhuma alteração no consumo de água e ração. Durante o período de observação não foram verificadas mudanças quando a produção de excretas. Da mesma forma não foi registrada nenhuma morte entre os animais tratados com esse monoterpeno.

O tratamento com epóxilimoneno em camundongos adultos em doses repetidas não induziu modificações no perfil bioquímico (Tabela 1). A maioria dos parâmetros permaneceu dentro da faixa de referência.¹⁴ No entanto, foi verificada no nível de AST uma redução de 5, 3 e 2 % ($p < 0,05$), nos grupos tratado com as doses de 25, 50 e 75 mg/kg do epóxilimoneno em relação ao grupo controle, respectivamente (Tabela 1). Por sua vez, na concentração da ALT foi detectado um aumento semelhante de 2 % apenas nas doses de 25 e 50 mg/kg em relação ao grupo controle, sugerindo que o aumento da dose não produz um aumento da toxicidade, uma vez que as alterações observadas em AST e ALT foram detectadas com as menores doses.

Tabela 1. Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de camundongos *Swiss*, tratados com epóxilimoneno

Parâmetros	Controle (n=10)	EL 25 (n=10)	EL 50 (n=10)	EL 75 (n=10)
Glicose (mg/dL)	88.80 ± 2.53	87.90 ± 0.63	88.20 ± 0.63	89.00 ± 2.87
Uréia (mg/dL)	48.71 ± 5.16	50.56 ± 8.59 ^a	55.70 ± 1.89 ^a	57.10 ± 2.67 ^a
Creatinina (mg/dL)	0.42 ± 0.04	0.39 ± 0.03 ^a	0.39 ± 0.03 ^a	0.44 ± 0.06 ^a
Ácido úrico (mg/dL)	2.21 ± 0.53	2.48 ± 0.55	2.58 ± 0.24	2.58 ± 0.23
Triglicerídeos (mg/dL)	108.6 ± 1.41	108.8 ± 0.89	108.0 ± 0.80	108.9 ± 2.17
Colesterol total (mg/dL)	87.50 ± 1.24	87.00 ± 0.44	87.00 ± 0.53	86.80 ± 0.35
Proteínas totais (mg/dL)	6.60 ± 0.16	6.72 ± 0.15	6.64 ± 0.17	6.66 ± 0.1887
ALT (U/mL)	56.88 ± 3.47	58.29 ± 4.82 ^a	58.40 ± 0.73 ^a	57.90 ± 1.76 ^a
AST (U/mL)	93.00 ± 15.54	88.40 ± 8.94 ^a	91.20 ± 7.92 ^a	90.60 ± 7.04 ^a
Fosfatase alcalina (U/I)	156.5 ± 2.37	156.9 ± 1.58	156.1 ± 1.25	158.8 ± 2.80 ^a
Bilirrubina total (mg/dL)	0.29 ± 0.05	0.29 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.29 ± 0.03
Bilirrubina direta (mg/dL)	0.17 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.17 ± 0.02

Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de camundongos machos *Swiss*, tratados por via oral com solução salina 0,9 % (controle, $n = 10$) e com epóxilimoneno (EL) nas doses 25 mg/kg (LE25, $n=10$), 50 mg/kg (LE50, $n=10$) e 75 mg/kg (LE75, $n=10$) durante 14 dias. Os valores representam a média ± E.P.M. do número de animais usados nos experimentos. n - representa o número de animais em cada grupo. ^a $p < 0,05$, quando comparados ao grupo controle (ANOVA e teste *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste).

Complementando o estudo de avaliação da toxicidade após o tratamento com doses repetidas do epóxilimoneno em camundongos adultos (EL25, EL50 e EL75) foram avaliados os parâmetros hematológicos, sendo observado que o monoterpenóide avaliado não produz alterações de importância clínica perfil hematológico (Tabela 2), uma vez que em todos dos parâmetros observados encontra-se dentro da faixa de referência para roedores.^{13,14}

Tabela 2. Parâmetros hematológicos de camundongos *Swiss*, tratados com epóxilimoneno

Parâmetros	Controle (n=10)	EL 25 (n=10)	EL 50 (n=10)	EL 75 (n=10)
Eritrócitos (mm ³)	6.71 ± 1.38	6.74 ± 2.37	6.92 ± 1.52	6.78 ± 1.21
Hemoglobina (g/dL)	14.57 ± 1.71	14.99 ± 0.85	14.83 ± 1.18	14.89 ± 1.88
Hematócrito (%)	46.00 ± 5.19	49.31 ± 2.54	46.04 ± 5.19	45.87 ± 5.17 ^a
VCM (fL)	66.00 ± 2.16	66.00 ± 1.04	66.10 ± 5.72	66.78 ± 1.30
HCM (pg)	22.43 ± 2.63	22.97 ± 0.50 ^a	22,50 ± 2,94	22.37 ± 4.51
CHCM (g/dL)	33.43 ± 2.87	33.65 ± 0.55	33.50 ± 1,18	33.41 ± 1.07
Plaquetas (mm ³)	445.4 ± 7.69	442.9 ± 58.5	444.1 ± 66.00	446.2 ± 54.42
Leucócitos totais (mm ³)	6.57 ± 1.71	6.66 ± 0.73	6.77 ± 2.12	6.94 ± 1.05
Neutrófilos (%)	22.71 ± 1.79	22.73 ± 14.82	22,80 ± 5,88	22.40 ± 5.37
Linfócitos (%)	65.96 ± 3.28	67.30 ± 4.89	70.10 ± 10.23 ^a	65.60 ± 4.50

Parâmetros hematológicos obtidos do sangue de camundongos machos *Swiss*, tratados por via oral com solução salina 0,9 % (Controle, n=10) e com epóxilimoneno (LE) nas doses 25 mg/kg (EL 25, n=10), 50 mg/kg (EL 50, n=10) e 75 mg/kg (EL 75, n=10) durante 14 dias. Os valores representam a média ± E.P.M. do número de animais usados nos experimentos. n – representa o número de animais em cada grupo. ^ap<0,05, quando comparados ao grupo controle (ANOVA e teste t-Student-Newman-Keuls como *post hoc* teste).

DISCUSSÃO

O estudo dos níveis de glicose é importante, uma vez que quando sua concentração está abaixo do normal, pode ser observado um quadro de hipoglicemia. Esse quadro produz vários sintomas (fraqueza, sudorese, desmaio e coma). Por sua vez a hiperglicemia pode causar polifagia, poliúria e dificuldade de cicatrização.¹⁵

No presente estudo não foi verificada alterações significativas na concentração sanguínea de glicose entre os animais dos grupos tratados com epóxilimoneno nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg em comparação ao grupo controle. Dessa forma, pode ser sugerido que epóxilimoneno de forma aguda pode não ser capaz de induzir quadro de hipo e/ou hiperglicemia.

A creatinina é um composto orgânico nitrogenado não proteico usado para diagnosticar vários problemas renais.¹⁶ A ureia é outro tipo de exame realizado no laboratório de análises clínicas, sendo o principal produto do metabolismo protéico.¹⁷ No entanto, a determinação de seu conteúdo não é tão específica para avaliação

da função renal, uma vez que é mais sensível a alterações primárias das condições renais. Dessa forma, é um marcador que tem forte importância em casos que envolvam esta condição.¹⁸

Outro parâmetro bioquímico importante na toxicidade aguda é o conteúdo do ácido úrico. É encontrado na urina em pequenas quantidades. No sangue humano, a concentração de ácido úrico encontra-se entre 3,5 e 7,2 mg/dL, podendo ser encontrado em níveis mais baixos nos vegetarianos.¹⁹ Os níveis anormais de ácido úrico no organismo podem ser associados a doenças como a gota.²⁰

A fosfatase alcalina é uma enzima mitocondrial que pode ser encontrada em vários tecidos, principalmente tecido ósseo, sistema hepato-biliar e mucosa gastro-intestinal; em menor grau nos rins, placenta e baço. Esta enzima é recomendada para avaliar a presença de colestase em animais.²¹

Em nosso estudo para avaliar a toxicidade aguda determinamos os níveis sanguíneos de creatinina e ácido úrico em camundongos tratados com solução salina 0,9% e nos animais tratados com epóxilimoneno nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg por via oral. Após 14 dias da administração não foi verificada alteração sanguínea de ácido úrico entre os animais dos grupos tratados com este monoterpeno em comparação ao grupo controle. Da mesma forma, quando comparados os níveis de ácido úrico dentre os grupos tratados com epóxilimoneno não foi verificada alterações, sugerindo que esse monoterpeno pode não induzir alterações da função renal, uma vez que não altera o metabolismo do ácido úrico. Outros trabalhos corroboram com o estudo, uma vez que outros monoterpenos também demonstram ausência de alterações destes parâmetros.^{22, 23}

Embora de um modo geral o perfil bioquímico dos animais estivesse dentro dos valores de referência,²⁴ houve exceções para a ureia, creatinina, triglicérides, AST e ALT. A alteração significativa verificada nos níveis plasmáticos de ureia e creatinina apenas nos grupos tratados com epóxilimoneno pode sugerir uma discreta alteração da função renal.

Com relação aos níveis séricos dos triglicérides foi detectada uma diminuição significativa nos camundongos tratados apenas com a dose de 25 mg/kg do epóxilimoneno. Diante desses efeitos pode ser sugerido um papel benéfico desse monoterpeno na redução sérica dos triglicérides que precisa ser melhor avaliado.

Os eritrócitos são essenciais para a manutenção da vida, uma vez que carregam e liberam oxigênio para os tecidos. Na formação deficiente de hemoglobina, intervêm fundamentalmente três fatores como a deficiência de ferro por redução da ingestão ou absorção anormal; a interferência na atividade normal das células macrofágicas; e as anormalidades renais que interferem na formação da eritropoietina.²⁷

O hematócrito refere-se à porcentagem de eritrócitos no sangue. Alterações na massa do eritrócito afetam o hematócrito e hemoglobina.²⁶ Estudos demonstram que alguns monoterpenos, extrato e o óleo essencial extraído de plantas medicinais como a *Piper aduncum* L., *Calendula officinalis* L., *Spigelia anthelmia* L. *Citrus limon* B., não produzem alterações nos níveis de eritrócitos,^{6,28,29} corroborando com os resultados encontrados no estudo. No presente estudo foi observado um aumento no hematócrito dos animais tratados apenas com a dose de 25 mg/kg com epóxilimoneno sugerindo que o uso em doses mais elevadas desse monoterpeno pode ser feito de forma segura.

O índice de Hemoglobina Corpuscular Média representa a quantidade média de hemoglobina por eritrócito, e apresenta um valor limitado no diagnóstico diferencial

das anemias, uma vez que a sua mensuração pode sofrer alterações, e estar diminuída em anemias microcítica e normocítica.²⁰

A avaliação das plaquetas é de bastante importância uma vez que já foram descritos casos de trombocitose devido à presença de doença crônica, deficiência de ferro, hiperadrenocorticismo, neoplasias e desordens no trato digestório. Por outro lado, a produção pode estar diminuída em problemas relacionados à medula óssea.³⁰

Os leucócitos são células produzidas na medula óssea que fazem parte do sangue juntamente com os eritrócitos e as plaquetas.³² Os neutrófilos fazem parte da porção do sangue responsável pela defesa ou imunidade do organismo, sua concentração no sangue pode ser aumentada em infecções bacterianas e diminuída em outras doenças como a anemia falciforme. Dessa forma, trabalhos anteriores corroboram com o estudo, uma vez que outros monoterpenos também demonstram ausência de toxicidade pela avaliação dos parâmetros hematológicos.²²

Os linfócitos representam um grupo heterogêneo de células tanto morfológica quanto funcionalmente sendo a base no desencadeamento e execução da resposta imune. A linfocitose pode ser causada por infecções crônicas, doenças autoimunes e terapias com drogas, por sua vez a linfopenia pode estar relacionada aos efeitos de fármacos como os esteróides.^{32,20} Em nosso estudo foi detectado um aumento no número de linfócitos em camundongos tratados com baixas doses do epóxilimoneno, corroborando com resultados relatados na literatura, nos quais alguns produtos extraídos de plantas medicinais como o terpenóidenerolidol, extrato hidroalcoólico de *Calendula officinalis* L., extrato acetato de etila de *Spigelia anthelmia* L. e óleo essencial de *Citrus limon* B. não produzem alterações nesse parâmetro.^{6, 23, 25, 28, 29}

Baseado nos resultados obtidos a partir dos estudos hematológicos e bioquímicos em camundongos adultos pode ser sugerido que a administração do epóxilimoneno não produz efeitos tóxicos sobre a maioria dos parâmetros analisados de camundongos *Swiss* adultos e pode ser usado de forma segura no tratamento clínico, na indústria alimentícia e farmacêutica. No entanto, novos estudos precisam ser realizados para avaliar os efeitos dos semoterpenos após o tratamento subcrônico e crônico para determinar a dose letal 50% (DL₅₀) e avaliar de forma mais detalhada se não há riscos quanto ao seu uso para a saúde humana.

Apoio Financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI).

REFERÊNCIAS

1. Bettega PVC, Czulniak GR, Piva R, Namba EL, Ribas CR, Grégio AMT, et al. Fitoterapia: dos canteiros ao balcão da farmácia. Arch. oral res. 2011;7(1):89-97.
2. Veiga Júnior VFJ. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. Rev. bras. farmacogn. 2008;18(2):308-13.
3. Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Óleos Voláteis. In: Simões CMO, Spitzer V, Editores. Farmacognosia: da planta ao

- medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC; 2004.
4. Thomas AF, Bessière Y. Limonene. Nat. Prod. Rep.1989;6(3):291-309.
5. Maróstica Junior MR, Pastore GM. Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. Quím. Nova. 2007;30(2):382-87.
6. Campêlo, LML. Avaliação farmacológica do óleo essencial de *Citrus limon* (Burm) no Sistema Nervoso Central: Um estudo comportamental, histológico e neuroquímico [dissertação] Teresina, (PI): Universidade Federal do Piauí; 2011.
7. Casuscelli SG, Crivello ME, Perez CF. Effect of reaction conditions on limonene epoxidation by supported Keggin heteropolycompounds. Appl. Catal., A. 2004;274(1-2):115-22.
8. Baseio JHB, Serra AA, Barboza JCS. "Green chemistry" epoxidação do limoneno sobsonicação com redução de solvente orgânico, empregando ácido metacloroperbenzóico (AMCPB) como agente oxidante. IX Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e V Encontro Latino Americano de Pós-Graduação: Anais do IX Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e V Encontro Latino Americano de Pós-Graduação 2005, São José dos Campos, São Paulo. São Paulo: UNIVAP, 2005. p. 24-26.
9. Arruda TA. Atividades Biológicas do Óleo Essencial de *Mentha x villosa* Hudson, *Rotundifolona* e Análogos sobre Microrganismos e Plasmídios de Resistência. [Tese Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos].Universidade Federal da Paraíba, Paraíba.155 f. 2007.
10. Von Holleben MLA, Schuch CM. Ativação do peróxido de hidrogênio para aepoxidação de olefinas não-funcionalizadas. Quím. Nova. 1997; 20(1):58-71.
11. Kaur D, Manktala R, Chahal KK, Chhabra BR. Epoxidation studies of terpenes with urea hydrogen peroxide and phosphotungstic acid. Indian J. Chem. Technol. 2010;49(5):598-602.
12. Waynforth BH. Injection techniques. In: WAYNFORTH, B.H. Experimental and Surgical Techniques in the Rat.London: Academic Press, 1980, p. 88-93.
13. Vasconcelos THC, Modesto Filho JVL. Estudo toxicológico pré-clínico agudo com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). Rev. bras. farmacogn. 2007;17(14):583-91.
14. Soto JCH, Oliveira RG, Meneguetti VC, Sacco SR. Policitemia e eritrocitose em animais domésticos: Revisão de literatura. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária. 2008;6(11):1-7.
15. Vieira RP, França RF, Carvalho CRF, Dolhnikoff M, Ribeiro W, Martins RABL. Efeitos da suplementação oral com creatina sobre o metabolismo e a morfologia hepática em ratos. Rev. bras. med. esporte. 2008; 14(1):38-41.
16. Soares Filho PJ, Kanaan S, Guzman Silva MA. Evaluation of hepatic glycogen correlated with serum glucose in castrated rats under tibolone treatment. J. bras. patol. med. lab. 2010; 4(5):561-8.

17. Vijayalakshmi T, Muthulakshmi V, Sachdanandam P. Toxic studies on biochemical parameters carried out in rats with Serankottainei, a siddha drug-milk extract of *Semecarpus anacardium* nut. J. Ethnopharmacol. 2000; 69 (1):9-15.
18. Spanaus K, Kollerits B, Ritz E, Hersberger M, Kronenberg F, Eckardstein AV. Serum creatinine, cystatin C, and β -trace protein in diagnostic staging and predicting progression of primary nondiabetic chronic kidney disease. J. bras. patol. med. lab. 2011; 47(1):13-23.
19. Emanuelli MP, Lopes STA, Maciel RM, Garmatz BC, Tavares MO. Concentração sérica de fosfatase alcalina, gama-glutamilttransferase, uréia e creatinina emcoelhos (*Oryctolagus cuniculus*). Ciênc. Anim. Bras. 2008;9(1):251-5.
20. Guimarães J, Devesa N, Reis R, Parente F, Alexandrino B, Moura JJ, et al. Ácido úrico e Doença cardiovascular. Med. interna. 2004;11(3):155-60.
21. Wallach J. Interpretação de exames laboratoriais. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2009.
22. Valente PP, Cattelan JW, Santana AE, Malheiros EB, Duarte CA, Rasera L, et al. Concentrações de fibrinogênio plasmático, fosfatase alcalina sérica e do fibrinogênio e fosfatase alcalina no fluido peritoneal de quinos submetidos à enterorrafiasoposicional e invaginante no cólon descendente. *Nucleus Animal*. 2009;1(2):95-106.
23. Costa DA, Oliveira GAL, Costa JP, Souza GF, Sousa DP, Freitas RM. Avaliação da toxicidade aguda e do efeito ansiolítico de um derivado sintético da carvona. Rev. bras. ciênc. saúde. 2012;16(3):303-10.
24. Nogueira Neto JD, Almeida AAC, Silva OA, Carvalho RBF, Sousa DP, Freitas RM. Avaliação da toxicidade aguda e das propriedades ansiolíticas do nerolidol em camundongos. Bio Far. 2012;8(2):42-56.
25. Doyama JT, Rodrigues HG, Novelli EL, Cereda E, Vilegas W. Chemical investigation and effects of the tea of *Passiflora alata* on biochemical parameters in rats. J. ethnopharmacol. 2005;96(3):371-4.
26. Rodrigues HG, Batista MTA, Fonseca LC, Aversi Ferreira TA. Efeitos de pesticidas sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos - Uma breve revisão. Biotemas. 2009;22(1):7-16.
27. Silva EJR, Aguiar FJS, Sousa IMV, Dimech GS, Franca MCCA, Coelho MCOC, et al. Avaliação do tratamento subcrônico com o extrato hidroalcoólico de *Calendula officinalis* L. Rev. bras. farmacogn. 2005;15(2):88-93.
28. Camurça Vasconcelos ALF, Melo LM, Nascimento NRF, Texeira PGM, Menezes DB, Morais SM, et al. Avaliação toxicológica do extrato acetato de etila de *Spigella anthelmia* Linn, em ratos e camundongos. Rev. bras. ciênc. vet.. 2005;12(1/3):46-52.
29. Lopes STA, Biondo AP, Santos AP. Manual de patologia clínica veterinária. 3. ed. Santa Maria: UFSM; 2007.
30. Franco DG, Segundo JP, Nardo CDD, Sueiro FAR, Castro KF, Dagnone AS. Leucemia canina: aspectos laboratoriais e clínicos - revisão de literatura. Vet. zootec. 2008;15(3):15-8.

31. Malafaia G, Rezende SA. O papel dúbio dos neutrófilos na infecção por parasitos do gênero Leishmania: uma breve discussão. SaBios. 2009;4(1):38-44.
32. Hariri AT, Moallem SA, Mahmoudi M, Hosseinzadehd H. The effect of crocin and safranal, constituents of saffron, against subacute effect of diazinon on hematological and genotoxicity indices in rats. Phytomedicine. 2011;18(6):499-504.

Recibido: 29 de abril de 2013.

Aprobado: 20 de diciembre de 2013.

Rivelilson Mendes de Freitas. Departamento de Bioquímica e Farmacologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Campus Universitário Ministro Petrônio Portella - Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil, CEP 64049-550, Telefone: +55 86 3237-1240. Correo electrónico: rivelilson.pg@cnpq.br